

Aus dem Institut für Vegative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. E. Heinz)

Die Beeinflussung des Wachstums des Ehrlich- Ascites-Tumors der Maus

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

in der gesamten Medizin

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Ekkehard Tiesler

aus Rabishau, Kr. Löwenberg

1962

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie der Universität
Frankfurt am Main

(Direktor: Prof. Dr. E. Heinz)

Die Beeinflussung des Wachstums des Ehrlich-
Ascites-Tumors der Maus

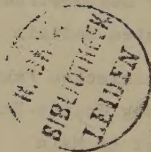
Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

vorgelegt von

Ekkehard Tiesler

aus Rabishau, Kr. Löwenberg

1962



Dekan : Prof. Dr. W. Krücke
Referent : Prof. Dr. R. K. Zahn
Korreferent: Prof. Dr. A. Wacker
Mündliche Prüfung: 10. November 1962

	Seite
1. Einleitung	4
2. Einführung zum Thema und Fragestellung	5
3. Material und Methoden	8
4. Versuchsergebnisse	11
1. Beeinflussung des Tumorstwachstums durch native Desoxyribonukleinsäure (DNS)	11
2. Beeinflussung des Tumorstwachstums durch fluoridierte DNS	12
a) Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg. im Abstand von 2 Tagen, beginnend mit dem 2. Tag nach Versuchs- beginn, insgesamt 4 mal.	12
b) Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg., täglich, be- ginnend mit dem 2. Tag nach Versuchsbeginn, ins- gesamt 6 mal.	12
c) Injektion von 1 ml DNS-F-40 Lsg. im Abstand von 2 Tagen, beginnend mit dem 2. Tag nach Versuchs- beginn, insgesamt 4 mal.	12
3. Beeinflussung des Tumorstwachstums durch mit N-Lost behandelte DNS (DNS-N-Lost 1).	13
a) Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Lsg. im Abstand von 2 Tagen, beginnend mit dem 2. Tag nach Ver- suchsbeginn, insgesamt 4 mal.	13
b) Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Lsg. im Abstand von 2 Tagen, beginnend mit dem 2. Tag nach Ver- suchsbeginn, insgesamt 3 mal.	15
c) Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Lsg. im Abstand von 2 Tagen, beginnend mit dem 4. Tag nach Ver- suchsbeginn, insgesamt 3 mal.	15
4. Vergleich der Toxizität von N-Lost und DNS-N-Lost 1 Lsg. auf Mäuse ohne Ascites-Tumor.	17
5. Diskussion	18
6. Zusammenfassung	24
7. Literaturverzeichnis	25

1. Einleitung.

Desoxyribonukleinsäuren können, neben ihren speziellen genetischen Aktivitäten, selbst oder als Derivate unter bestimmten Voraussetzungen hochwirksame biologische Agentien sein. Die vorliegende Arbeit will einen weiteren Beitrag zu diesem Thema liefern.

1932 gelang es Mitarbeitern Robert Kochs, Loewenthal und Jahn¹⁾, das Ehrlich-Ascites-Carcinom der Maus in den Ehrlich-Ascites-Tumor zu überführen.

Seit dieser Zeit findet der Ehrlich-Ascites-Tumor weitverbreitete Anwendung in der experimentellen Forschung der Chemotherapie²⁻⁶⁾, zur Klärung von Fragen von Stoffwechselmechanismen⁷⁾, und genetisch morphologischer Fragen⁸⁾.

Auch in dieser Arbeit wurde der Ehrlich-Ascites-Tumor als Testobjekt⁹⁾ zur Prüfung für die biologische Wirksamkeit von nativer Desoxyribonukleinsäure und deren Derivaten herangezogen.

2. Einführung zum Thema und Fragestellung

Seit längerem ist die Bedeutung der DNS mit ihrer Lokalisation in den Chromosomen als genetisches Material mit der Fähigkeit zur Merkmalsauslösung, identischen Reduplikation und Mutation bekannt. Sie steht damit im Mittelpunkt der Zellentwicklung. Ohne DNS-Synthese ist eine Zellvermehrung nicht möglich.

Schon in diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der DNS-Synthese und aller damit verbundenen Einzelheiten, denn eine Störung der DNS-Synthese muß zwangsläufig mit einer Hemmung der Zellentwicklung einhergehen und umgekehrt eine Förderung derselben mit deren Beschleunigung.

Welche Voraussetzungen für das Zustandekommen der DNS-Synthese sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt bekannt?

Diese Frage s c h e i n t leicht beantwortet zu sein, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es kürzlich Kornberg und seiner Gruppe (17,18,19) gelungen ist, eine DNS-Synthese in vitro zu vollziehen:

Mittels der von dieser Gruppe aus *E. coli* isolierten Desoxyribonukleotid-Polymerase kommt es in der Anwesenheit der am DNS-Aufbau beteiligten vier Desoxyribonukleotide, den Nukleosidtriphosphaten des Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin unter einer Voraussetzung zur DNS-Synthese: ein sog. "primer" muß vorhanden sein, d.h. eine einstrangige DNS im Gegensatz zur zweistrangigen nativen DNS. Für die native DNS haben Watson und Crick (20,21) den doppelstrangigen Helix als Sekundärstruktur nachweisen können.

In vitro gelingt es, z.B. durch Erhitzen, aus einer zweistrangigen eine einstrangige DNS zu erhalten. (29)

Wie aber kommt es in der intakten Zelle, in der die native, zweistrangige DNS vorliegt zur "Primerbildung"?

Hier gibt die von R.K. Zahn (22) erarbeitete, in folgenden als "Primerbildungstheorie" bezeichnete Vorstellung einen Aufschluß. Die stets in der Zelle vorkommende Desoxyribonuklease (DNase) bewirkt intermediär eine Spaltung der zweistrangigen DNS und macht sie dadurch zum "Primer", an dem sich die DNS-Synthese unter obigen Voraussetzungen vollziehen kann. Mit anderen Worten, die native DNS ist durch DNase voll spalt- und denaturierbar.

Soweit kurz die Frage zur DNS-Synthese.

Dass DNase einen fördernden Effekt auf die Zellteilungsrate ausübt, konnte durch Zahn und Mitarb. (23,24,25,26,27) nachgewiesen werden, es konnte aber auch gezeigt werden, dass dieser Effekt durch gleichzeitige Gabe von nativer artfremder oder arteigener DNS

aufgehoben wird und im Gegensatz dazu eher eine Hemmung resultiert²⁴⁾. Kürzlich erfolgte Publikationen v. Eulers^{32,33)} stimmen in ihren Ergebnissen an anderen Objekten bezüglich der Hemmwirkung der DNS überein.

In den hier ausgewerteten Versuchen am Ehrlich-Ascites-Tumor hat sich nur geringfügige Hemmung erzielen lassen, die sich in der statistischen Auswertung als nicht signifikant erwies.

Wenn nach der Primerbildungstheorie die DNase als Primer-bildendes Enzym anzusehen ist, dann müßte die DNase durch solche Desoxyribonukleinsäuren gehemmt werden, die durch sie nicht voll spalt- bzw. denaturierbar wären.

Um einen Hemmeffekt auf die DNS-Synthese und damit auf die Zellentwicklung zu erzielen, gilt es, solche DNS-Analoga zu finden, die durch die betreffenden zelleigenen DNasen nicht voll spalt- oder denaturierbar sind.

Für solche DNS-Analoga müßte sich die Voraussage machen lassen, dass sie als Hemmer der DNS-Synthese besonders wirksam sind.

Diese nicht Spaltbarkeit müßte sich z.B. bei DNS-Analogen mit inneren Verklebungen, d.h. Hauptvalenzbindungen zwischen den DNS-Strängen, finden.

In den folgenden Versuchen wurden bezüglich ihrer Hemmwirkung getestet:

1. Native, hochpolymere Desoxyribonukleinsäure (DNS),
2. mit monofunktionellen Agentien behandelte DNS,
3. mit bifunktionellen Agentien behandelte DNS.

Als monofunktionelles Agens wurde in vorliegendem Fall Fluor verwandt. Durch dieses kann es wahrscheinlich zu keinen Verklebungen innerhalb des DNS-Moleküls kommen.

Als bifunktionelles Agens wurde u.a. N-Lost verwandt. Mittels N-Lost kann es, wie Brookes und Lawley⁵⁶⁾ nachgewiesen haben, zu Verklebungen innerhalb des doppelsträngigen DNS-Moleküls kommen. Nach unseren obigen Ausführungen und Voraussagen, müßte sich hier im Hinblick auf die Hemmwirkung der DNS-Synthese eine wesentliche Potenzierung in der Wirkung auf die Zellentwicklung finden.

Der Ehrlich-Ascites-Tumor erwies sich in der folgenden Fragestellung als besonders geeignet. Als flüssiger Tumor mit relativ leichter Züchtbarkeit, der hohen Zellteilungsrate und des nicht vorhandenen soliden Gewebsverbandes, gewährt der Ascites-Tumor den direkten Kontakt mit dem zu prüfenden Agens.

Unter teilweiser Vorwegnahme der Ergebnisse ergibt sich also für die Versuchstestung folgende Fragestellung:

1. Ändert hochpolymere, native DNS das Wachstum des Ehrlich-Ascites-Tumors?

In unseren Versuchen konnten wir keine signifikante Änderung finden.

2. Verändert eine mit monofunktionellem Agens behandelte DNS das Zellwachstum des Ehrlich-Ascites-Tumors?

Hier ließ sich nur in wenigen Versuchen eine signifikante Hemmung nachweisen.

3. Wie wird das Wachstum des Ehrlich-Ascites-Tumors durch eine mit befunktionellen Agentien behandelte DNS beeinflusst?

In unseren Versuchen kam es in jedem Fall zu einer absoluten Hemmung, in keinem Fall ließen sich Anzeichen für Ascites-Tumor nachweisen.

Die sich aus der Beantwortung dieser letzten Frage ergebenden möglichen therapeutischen Aspekte werden in weiteren noch in Gang befindlichen Untersuchungen, für die schon teilweise Ergebnisse vorliegen, weiter verfolgt.

Material und Methoden.

Die ersten Versuche wurden mit insgesamt ca. 2000 ♂ Mäusen im Gewicht zwischen 20 - 24 g vom Stamm Kirst ausgeführt. Große Streuungen und uneinheitliche Ergebnisse ließen keine eindeutigen Aussagen in der Versuchsbewertung zu. Mikrobiologische Untersuchungen enthüllten bei diesem Stamm eine latente Ektromelie und z. T. Salmonellosen. Nach Untersuchungen von J. Koprowska wird das Wachstum des Ascites Tumors in ausgedehntem Maße durch neurotrope Viren beeinflusst¹⁰⁾. Als solches ist das Ektromelie-Virus anzusehen.

Wir stellten daraufhin unsere Mäuseversuchstierhaltung nach Raumesinfektion vollständig auf einen neuen Stamm um, der frei von neurotrophen Viren ist. Diesen erhielten wir vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover. Es handelt sich um den NMR I Stamm. Für die Versuche wurden nur ♂ Tiere mit einem Ausgangsgewicht zwischen 20-24 g verwendet.

Die Tiere wurden in sterilisierbaren Makrolonkäfigen gehalten, als Streu nahmen wir sterilisierten Torfmull. Die Raumtemperatur wurde auf 22 ° C geregelt.

Die Tiere wurden allein mit standardisiertem Futter in Pellettenform ernährt, hergestellt und geliefert vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover. Das Trinkwasser erhielt alle 2 Tage einen Polyvitaminzusatz (3 gtt. Viliquid[®]/0,5 l Wasser).

Unter diesen Bedingungen waren bei den Tieren keinerlei Krankheits- und Ausfallerscheinungen zu beobachten. Die Gewichtskurven verliefen stetig. Die Tiere verhielten sich ruhig und bissen sich nicht. Mäuse mit Ehrlich-Ascites-Tumor überließen uns dankenswerter Weise die Farbwerke Höchst. Eine mikrobiologische Untersuchung ergab keinen Anhalt für einen Befall mit neurotrophen Viren. Ein Ascitesstamm wurde durch wöchentliches Überimpfen gehalten.

Wöchentlich wurden 120 ♂ NMR I Mäuse im Gewicht von 20 - 24 g in vier Gruppen zu 30 bzw. 6 zu 20 gewichtsmäßig vorsortiert.

Innerhalb einer Gruppe wurden die Tiere statistisch gegriffen¹¹⁾ A, BB, AA... , die eine Hälfte wurde für den Versuch, die andere als Kontrolle vorgesehen.

Die Versuchstiere, die DNS, bzw. deren Derivate erhalten sollten, wurden mit einer Kofferdamlochzange am rechten Ohr gezeichnet, zusätzlich mit einem KMnO_4 -Fleck am Rückenfell zur schnelleren Orientierung kenntlich gemacht. Die entsprechende Anzahl von Kontrollen im Versuchsansatz wurden nicht gezeichnet.

Am ersten Tag eines Versuches wurden den Tieren, die DNS oder DNS-Derivate erhalten sollten (im folgenden als Versuchstiere be-

zeichnet) und Kontrollen 0,2 ml Ascites intraperitoneal mittels einer 1 ml-Tuberkulinspritze, die mit einer 20 iger Nadel versehen war, gegeben. Der Ascites wurde vorher den Ascites-Stamm-Mäusen, der vor 11 Tagen diesen injiziert worden war, unter aseptischen Kautelen entnommen und mittels steriler physiologischer Kochsalzlösung auf einen Hämatokritwert von 28,0 eingestellt. Der Hämatokritwert wurde mit einer Mikro-Hämatokritzentrifuge der Fa. Hawksley & Son, London, erhalten. Die 0,2 ml Ascites enthielten somit $3 \cdot 10^7$ Zellen.

Die zu prüfenden Lösungen wurden den Versuchstieren am 2., 4., 6. und 8. Tag nach Versuchsbeginn unter aseptischen Kautelen intraperitoneal injiziert oder in einigen Fällen täglich. Die Kontrollen erhielten in den selben Zeitintervallen das gleiche Volumen steriler physiologischer Kochsalzlösung.

Das Wachstum der in Versuch genommenen Tiere wurde durch Wiegen alle zwei Tage verfolgt^{9,13)}.

Meistens wurde der Versuch nach 12 Tagen abgestoppt, die Tiere mit Chloroform betäubt und getötet. Für die Hämatokritbestimmung und für Ausstriche wurde zunächst etwas Ascites entnommen und dann der Rest des verbliebenen Ascites nach Eröffnung der Bauchhöhle entfernt. Die Ascitesmenge wurde aus der Differenz von Lebendgewicht und Gewicht nach Ascitesentfernung errechnet.

Die Ausstriche wurden noch feucht mit Nissenbaum-Fixativ¹⁶⁾ behandelt, mit Aqua bidest. gespült und gewässert und 24 h mit Gallocyaninchromalaun gefärbt⁶⁸⁾ zur Bestimmung der Mitoserate¹³⁾.

Die statistische Auswertung erfolgte in den meisten Fällen nach Students t-Test zur Signifikanzbestimmung, in einigen Fällen nach dem von van der Waerden vorgeschlagenen parameterfreien x-Test¹¹⁾.

Die für die Injektion verwandte native DNS war eine DNS aus Forelleneiern²⁰⁾, sie wurde 3 mg/ml physiologischer Kochsalzlösung angesetzt.

Zur Herstellung der mit Fluor veränderten DNS wurden 204,6 mg Forellen - DNS mit 16,6 mg Fluor behandelt, im folgenden als DNS-F-20 bezeichnet, bzw. auf 206,5 mg Forellen - DNS wirkten 33,2 mg Fluor ein, im folgenden DNS-F-40 genannt.

Die erhaltenen Verbindungen wurden in jeweils 200 ml physiologischer Kochsalzlösung eingebracht. Ein Teil der DNS-F blieb jeweils unlöst. Es wurde nur der abdekantierte Überstand verwendet.

Der DNS-Gehalt des Überstandes betrug bei der DNS-F-20 ca. 0,44 mg/ml, bei der DNS-F-40 ca. 0,73 mg/ml.

Für die Herstellung der mit N-Lost behandelten DNS, im folgenden DNS-N-Lost 1 genannt, wurden 150 mg Forellen-DNS mit 100 mg N-Lost

behandelt. Das Endprodukt wurde 15 mal mit 50 ml Äthanol gewaschen und 20 h bei Raumtemperatur u. 1 mm Hg über P_2O_5 /KOH getrocknet. 100 mg von dem Produkt wurden mit 100 ml phys. Kochsalzlösung versetzt. Ein Teil blieb ungelöst, aber auch hier wurde nur der abdekantierte klare Überstand verwendet, dessen DNS-Gehalt ca. 0,27 mg/ml betrug.

Die native DNS wurde jeden 2. Tag injiziert: 1 ml insgesamt 4 mal, die DNS-F - Lösungen ebenfalls, in anderen Versuchen bei der DNS-F-20 aber auch täglich: 1 ml insgesamt 4 mal, bzw. 6 mal.

Die DNS-N-Lost 1 Lösung wurde jeden zweiten Tag injiziert: 1 ml insgesamt 4mal, bzw 3 mal.

Eine Toxizitätsprüfung an Lebigates für die DNS-N-Lost 1 in einer Verdünnung 1 : 50 mit Wasser ergab gegenüber Wasser allein während 4 1/2 h keinen sichtbaren Unterschied.

V Versuchsergebnisse:

Das Tumorstwachstum wurde an Hand der Gewichtskurven bestimmt und die Gewichte zur Signifikanzbestimmung herangezogen. Wenn sich auf diese Weise keine Signifikanz errechnen ließ, führten in einigen Fällen die Auswertung der Hämatokritwerte und der Ascitesmenge noch zur Signifikanz.

Die Mitoserate brachte uns in unseren Versuchen zu keinen besseren Ergebnissen als die anderen Methoden. Eine Auswertung beim Vergleich von Mäusen mit und ohne Ascites war nicht möglich.

1. Beeinflussung des Tumorstwachstums durch hochpolymere native DNS bei viermaliger Injektion von 1 ml DNS-Lösung (3mg/ml) im Abstand von 2 Tagen:

Bei insgesamt viermaliger Injektion am 2., 4., 6. und 8. Tag nach Versuchsbeginn liefen die Gewichtskurven von den mit DNS behandelten Versuchstieren und Kontrollen im Bereich einer biologischen Streuung parallel.

Fig. 1 gibt eine solche Gewichtskurve wider.

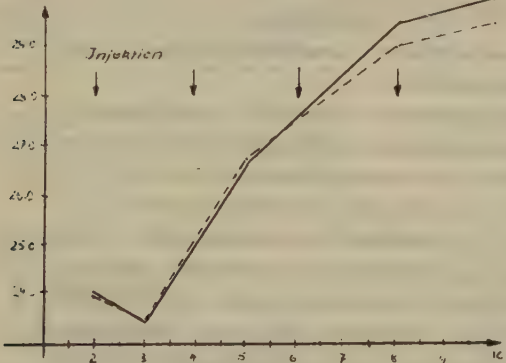


Fig. 1

— Versuchstiere, 4 malige Injektion von 1 ml DNS-Lsg.
-- Kontrollen, 4 malige Injektion von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung

Tage nach Versuchsbeginn

Die hier gefundenen Ergebnisse waren nicht einmal schwach signifikant. Auch die Auswertung der Hämatokritwerte führte zu keinen besseren Ergebnissen.

Mehrfache Wiederholung der Versuche unter den gleichen Bedingungen brachten keine anderen Resultate.

2. Beeinflussung des Tumorwachstums durch DNS-F

a) Beeinflussung des Tumorwachstums bei insgesamt 4 maliger Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg. im Abstand von 2 Tagen.

Hier konnten zwar geringe Unterschiede im Durchschnittsgewicht von Versuchstieren und Kontrollen festgestellt werden, Signifikanzbestimmungen führten jedoch nicht zur Sicherung des Effektes. Der Versuch wurde mit 3mal 15:15 Mäusen durchgeführt.

Fig. 2 gibt die Gewichtskurve eines solchen Versuches wider.

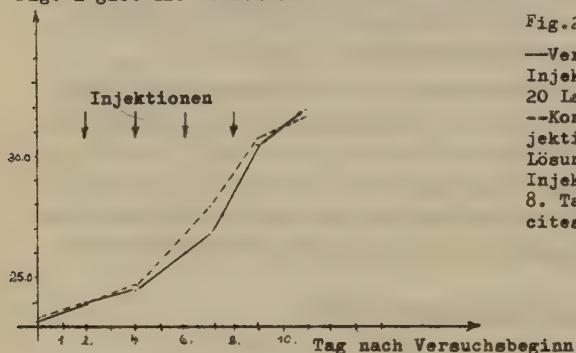


Fig.2

—Versuchstiere: 4 malige Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg.
 --Kontrollen: 4 malige Injektion von 1 ml phys. NaCl-Lösung.
 Injektionen am 2., 4., 6. u. 8. Tag nach Setzen des Ascites-Tumors.

b) Beeinflussung des Tumorwachstums bei insgesamt 6 maliger Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg. täglich.

Bei insgesamt 6 maliger Injektion konnten wir z.T. signifikante Hemmung des Tumorwachstums nachweisen, teils schwach über die Gewichte, teils durch Auswertung der Hämatokritwerte.

Bereits nach der 4. bzw. 5. Injektion bei täglicher Applikation, zeigten die Versuchstiere aber Symptome wie Bewegungsarmut, Freßunlust, Mattigkeit, die auf Schädigung der Versuchstiere durch die DNS-F-20 hinwiesen. Ein Teil der Versuchstiere starb vor Abstoppen des Versuches. Die vollständige Rückbildung des einmal angegangenen Ascites-Tumors konnte bei keinem der Versuchstiere erreicht werden.

Fig. 3 zeigt den Verlauf der Gewichtskurve bei 6 maliger Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg., Tab. 1 die nach Abstoppen des Versuches gewonnenen Hämatokritwerte. Tab.2 gibt die statistische Auswertung.

c) Beeinflussung des Tumorwachstums bei insgesamt 4 maliger Injektion von 1 ml DNS-F-40 Lsg. im Abstand von 2 Tagen.

Unterschiede waren auch hier zwischen den Durchschnittsgewichten von Kontrollen und Versuchstieren feststellbar, jedoch führten Signifikanzbestimmungen nicht zur Sicherung des Effekts. Die Versuche wurden mit 3 mal 15:15 Tieren durchgeführt.

Fig. 4 gibt eine solche Kurve wider.

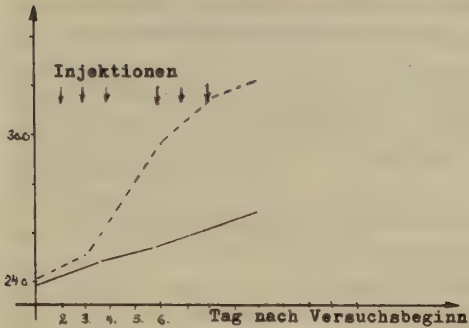


Fig. 3
Gewichtskurve von 10 : 10 Ascites-Tumor-Mäusen
—Versuchstiere: 6 malige Injektion von 1 ml
DNS-F-20 Lsg.
--Kontrollen: 6 malige Injektion von 1 ml phy-
siologischer Kochsalzlösung
Injektionen am 2., 3., 4., 6., 7. und 8 Tag nach
Versuchsbeginn.

Tab. 1

Hämatokritwerte	
Versuch	20,5
	10,5
	9,5
	12,0
	9,5
Kontrollen	24,5
	24,5
	26,0
	30,0
	16,0
	30,5
	20,5
	15,5
	33,5

Tab. 2
Statistische Auswertung von Gewichts- und Hämatokritwerten.
Einfluß der 6 maligen Injektion von 1 ml DNS-F-20 Lsg. auf das
Tumorstadium

	N	t-Test	x-Test
1. Versuch Gewichte	8	t=3,53	
Kontrolle	10	P<0,01	
2. Versuch Hämatokritwerte	5		x=4,07
Kontrolle	9		P<0,005

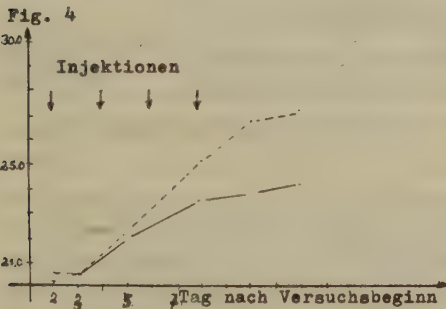


Fig. 4
Gewichtskurve von 15 : 15
Ascites-Tumor-Mäusen
—Versuchstiere: 4 malige In-
jektion von 1 ml DNS-F-40
Lsg.
--Kontrollen: 4 malige Injekt.
von 1 ml phys. Kochsalzlsg.
Injektionen am 2., 4., 6. und
8. Tag nach Versuchsbeginn.

3. Beeinflussung des Tumorstadiums durch DNS-N-Lost 1

a) Beeinflussung des Tumorstadiums bei 4 maliger Injektion von 1 ml
DNS-N-Lost 1 Lösung am 2., 4., 6. und 8. Tag nach Setzen des Ascites-
Tumors.

Schon nach der 1. Injektion ließ sich ein starkes Auseinanderweichen

der Gewichtskurven von Versuch und Kontrolle nachweisen. Während die Kurve der Kontrollen in der üblichen Weise steil ansteigt, findet sich bei den Versuchstieren in dem weiteren Verlauf der Gewichtskurve eine Gewichtsabnahme von maximal 10 - 11 %. Zwischen dem 11. und 12. Tag nach Versuchsbeginn wird das Ausgangsgewicht bei den Versuchen wieder erreicht. Bei den Versuchstieren konnte Ascites-Tumor auf keine Weise nachgewiesen werden.

Bei den Kontrollen war ein steiles Ansteigen der Gewichtskurve bis zum 15. Tag nach Versuchsbeginn nachweisbar. Dann verstarben die Tiere nach Erreichen eines kritischen Gewichts im weiteren Verlauf. Nach 30 Tagen lebten die Versuchstiere (Tiere mit DNS-N-Lost 1 behandelt) ohne Ausnahme, auch zu diesem Zeitpunkt ließ sich kein Ascites-Tumor nachweisen. Eine Wiederholung des Versuches führte zu dem gleichen Ergebnis.

Die Gewichtskurve eines solchen Versuches gibt Fig. 5 wider.

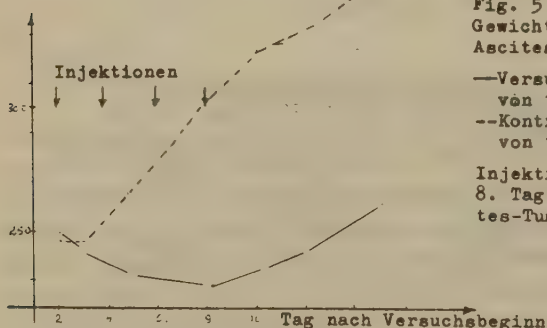


Fig. 5
Gewichtskurve von 15:15
Ascites-Tumormäusen

—Versuch: 4 malige Injekt.
von 1 ml DNS-N-Lost 1 Lsg.
--Kontrollen: 4 malige Injekt.
von 1 ml phys. NaCl-Lsg.

Injektionen am 2., 4., 6. u.
8. Tag nach Setzen des Ascites-Tumors.

Schon am 5. Tag nach Versuchsbeginn war der Gewichtsunterschied von Versuch und Kontrolle hochsignifikant, der im weiteren Verlauf des Versuches weiter stark zunahm. Die statistische Auswertung gibt Tab. 3 wider.

Tab. 3

Einfluß der 4 maligen Injektion von DNS-N-Lost 1 von 1 ml der Lsg. auf das Tumorstadium am 2., 4., 6., und 8. Tag nach Versuchsbeginn.
Vergleich der Gewichte

	N	t-Test	N	t-Test	N	t-Test	N	t-Test	N	t-Test
Tag n. Vers. Beg.	5.		8.		10.		12.		15.	
Versuche	15	t=6,58	15	t=7,58	15	t=8,45	15	t=6,90	15	t=6,92
Kontrollen	15	P<0,001	14	P<0,001	14	P<0,001	11	P<0,001	7	P<0,001

Ein Vergleich und damit eine Auswertung der Hämatokritwerte war bei diesem Versuch nicht möglich, da bei keinem der Versuchstiere im Gegensatz zu den Kontrollen ein Ascites-Tumor nachweisbar war.

b) Beeinflussung des Tumorstwachstums bei 3 maliger Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Leg. am 2., 4., und 6. Tag nach Setzen des Ascites Tumors.

Hier erreichten die Versuchstiere bereits am 7. Tag nach Versuchsbeginn nach nur 1 - 2 % Gewichtsabnahme ihr Ausgangsgewicht wieder.

Der Verlauf der Gewichtskurve der Kontrollen war entsprechend dem unter a) angeführten Verlauf.

Die Gewichtskurven der mit DNS-N-Lost 1 behandelten Tiere und Kontrollen sind in Fig. 6 widergegeben.

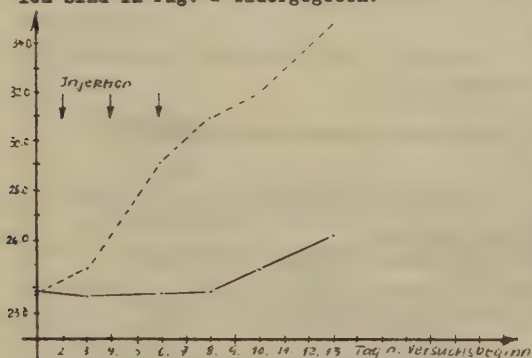


Fig. 6
Gewichtskurve von 15:15
Ascites Tumor Mäusen

— Versuch: 3 malige Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Leg.
--- Kontrollen: 3 malige Inj. von 1 ml phys. NaCl Leg.

Injektionen am 2., 4. und 6. Tag nach Setzen des Asc.

Auch hier konnte nach 30 Tagen bei keinem der mit DNS-N-Lost 1 behandelten Tieren Ascites-Tumor nachgewiesen werden.

Tabelle 4 gibt die statistische Auswertung wider.

Tab. 4 Einfluß der 3 maligen Injektion von DNS-N-Lost 1 von 1 ml der Leg. auf das Tumorstwachstum am 2., 4., und 6 Tag nach Versuchsbeginn.

Vergleich der Gewichte

	N t-Test 6.	N t-Test 8.	N t-Test 10.	N t-Test 13.
Tag n. Vers. Beginn				
Versuch	15 t=6,54	15 t=6,92	15 t=7,15	15 t=10,73
Kontrollen	15 P<0,001	15 P<0,001	14 P<0,001	9 P<0,001

c) Beeinflussung des Tumorstwachstums bei 3 maliger Injektion von 1 ml DNS-N-Lost 1 Leg. am 4., 6. und 8. Tag nach Setzen des Ascites Tumors.

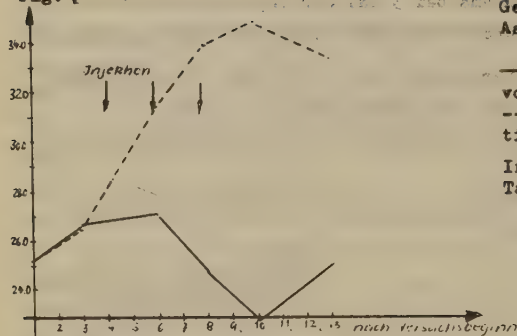
Die Gewichtskurven von Versuch und Kontrolle laufen hier bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn parallel. Nach der 1. Injektion beginnt bereits die Gewichtskurve der mit DNS-N-Lost 1 behandelten Tiere wesentlich flacher zu verlaufen, während die Kurve der Kontrollen unverändert steil weiterläuft.

Nach der 2. Injektion wird das Ausgangsgewicht bereits unterschritten, um bei der 3. Injektion um 9 - 10 % darunter zu liegen.

Schon nach der 1. Injektion beginnt der Gewichtsunterschied signifikant zu werden, im weiteren Versuchsverlauf nimmt die Differenz weiter zu.

Fig. 5 gibt die Gewichtskurve von Versuch und Kontrolle wider.

Fig. 7



Gewichtskurve von 10 : 10
Ascites-Tumor-Mäusen.

— Versuch: 3 malige Injektion
von 1 ml DNS-N-Lost 1 Lsg.
--- Kontrollen: 3 malige Injek-
tion von 1 ml phys. NaCl-Lsg.
Injektionen am 4., 6. und 8.
Tag nach Setzen des Ascites.

Tab. 5 gibt die statistische Auswertung, Auswertung zur Gewichts-
kurve der Fig. 7

Tab. 5 Einfluß der 3 maligen Injektion von DNS-N-Lost 1 von 1 ml der
Lsg. auf das Tumorstadium am 4., 6. und 8. Tag nach Versuchsbeginn.

Vergleich der Gewichte

Tag n. Vers. Beginn	N t-Test 6.	N t-Test 8.	N t-Test 10.	N t-Test 13.
Versuch	10 t=3,79	10 t=7,36	10 t=8,70	10 t=6,56
Kontrollen	10 P<0,01	10 P<0,001	10 P<0,001	8 P<0,001

Bei den Tieren, die DNS-N-Lost 1 erhalten hatten, war auch nach 30
Tagen nach Versuchsbeginn ein Ascites Tumor nicht nachweisbar.

Versuche, 1. die Zeit zu bestimmen, nach der nach Setzen des Ascites
Tumors noch eine volle Regression des Tumors eintritt und

2. die Grenzdosis zu ermitteln, die noch zur vollen Rückbildung
des Tumors führt, sind noch im Gange.

4. Vergleich der Toxizität von N-Lost und DNS-N-Lost 1 auf Mäuse ohne Ascites-Tumor.

Pro ml DNS-N-Lost 1 Lösung wurde ein N-Lost Äquivalent von ca. 1 : 10 errechnet.

Täglich wurden bei 10 : 10 Mäusen den Versuchstieren 0,056 mg N-Lost in 2 ml injiziert, den Kontrollen 2 ml phys. Kochsalzlösung.

Zum Vergleich wurden bei 9 : 9 Mäusen den Versuchstieren als Äquivalent 2 ml DNS-N-Lost 1 Lösung, den Kontrollen 2 ml phys. Kochsalzlösung gegeben.

Die Gewichtskurven sind in Fig. 8 widergegeben.

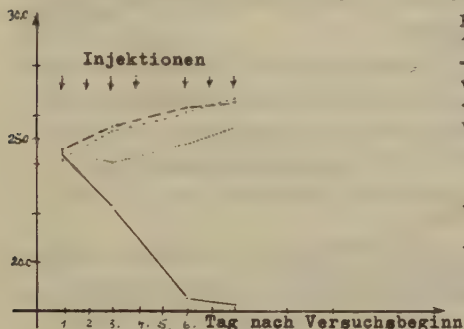


Fig. 8
10:10 Mäuse ohne Ascites-Tumor
— Versuchstiere: 7 malige Injekt.
von 0,056 mg N-Lost/ 2 ml
-- Kontrollen: 7 malige Injekt.
von 2 ml phys. Kochsalzlösung.

9: 9 Mäuse ohne Ascites-Tumor
... Versuchstiere: 7 malige Inj.
von 2 ml DNS-N-Lost 1 Lsg.
... Kontrollen: 7 malige Injekt.
von 2 ml phys. Kochsalzlösung

Bereits nach der 6. Injektion waren 5 Versuchstiere, die N-Lost, 0,056 mg pro 2 ml täglich erhalten hatten, verstorben, die restlichen Versuchstiere waren in elendem Zustand.

Signifikanzbestimmungen lieferten bald stark gesicherte Unterschiede. Anders verliefen die Gewichtskurven bei den Versuchstieren, die 2 ml DNS-N-Lost 1 Lsg. erhalten hatten und den entsprechenden Kontrollen. Keines der Tiere verstarb im gleichen Zeitraum, der Gewichtsunterschied von Versuchs- und Kontrolltieren war zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Diskussion

Von der DNS lassen sich Derivate herstellen. Die Bausteine der DNS sind Polynukleotide, die wiederum aus Desoxyribose, Phosphorsäure und Purin- bzw. Pyrimidinbasen zusammengesetzt sind.

Veränderungen sind denkbar in den Bausteinen Desoxyribose, Phosphorsäure und Stickstoffbase, aber auch in der Sekundärstruktur des Doppelhelix.

Die hier interessierenden Veränderungen beziehen sich auf solche in der Sekundärstruktur des Doppelhelix und an den Stickstoffbasen.

Die vier Stickstoffbasen, die am DNS - Aufbau beteiligt sind, zeigen in ihrer Reaktivität Unterschiede.

Fig. 9 nach B. und A. Pullmann⁴⁷⁾ ermöglicht einen schnellen Überblick über die hauptsächlichsten chemischen und physikochemischen Angriffspunkte der in den Nukleinsäuren enthaltenen Stickstoffbasen. Wie aus diesem Schema ersichtlich ist, bedarf es zur Veränderung der Pyrimidinstruktur relativ drastischer Maßnahmen, wie 6 n HCl bei 100°C und Hydrazinolyse^{48,49)}.

Wie weiter aus Fig. 9 ersichtlich ist, zeigt der Adeninring im Nukleinsäureverband eine bemerkenswerte Stabilität gegenüber chemischen Agentien, nur die NH_2 -Gruppe in Stellung 6 reagiert als extracyclische Gruppe leicht mit alkylierenden Agentien und Formaldehyd. Adenin-nukleoside und -nukleotide werden hauptsächlich in Position 1 alkyliert^{52,53)}.

Das Guanin wird im Nukleinsäureverband leicht in Position 7 alkyliert^{50,51)}. Es zeigt sich, dass Guanin von den vier Stickstoffbasen am leichtesten mit alkylierenden Agentien reagiert, geringe Mengen derselben sogar nur allein mit dem Guanin⁵⁴⁾.

Die Alkylierung schwächt die Desoxyribosid-Bindung und 7-Alkylguanin bricht aus der DNS heraus⁵⁵⁾.

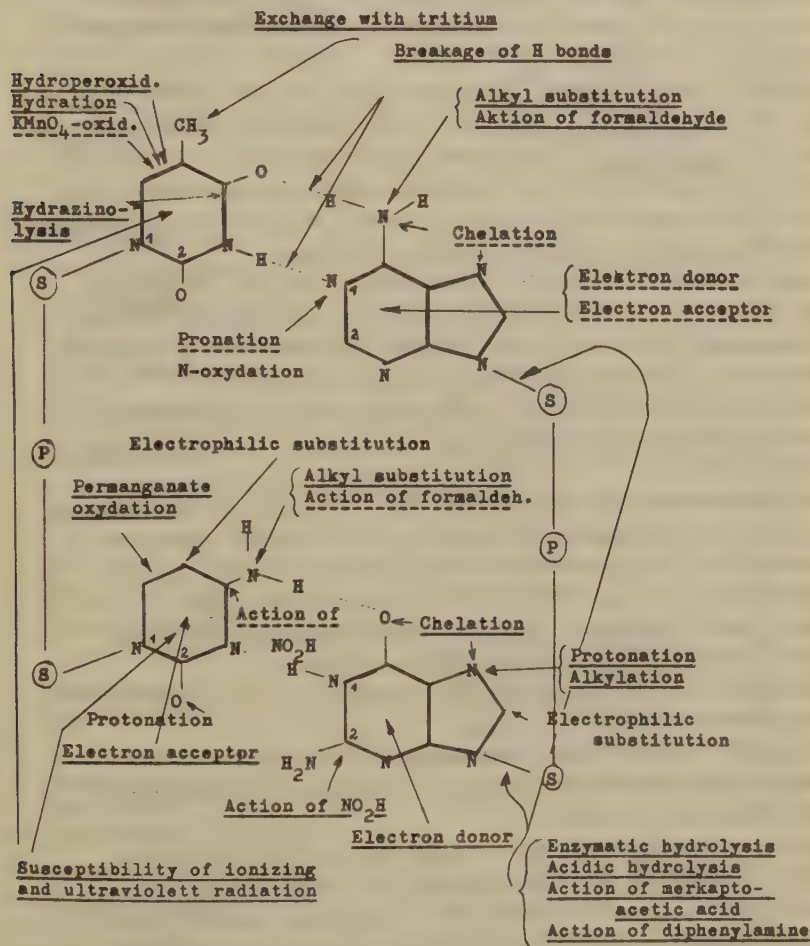
Diese Betrachtungen gelten für monofunktionelle alkylierende Agentien. Bei bifunktionellen alkylierenden Agentien, wie N-Lost von der Formel $(\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{HCH}_3$, besteht noch eine andere Möglichkeit, und zwar die, dass es zwischen zwei der DNS-Stränge über das bifunktionelle Agens zur Hauptvalenzbindung kommt, indem je ein Guanin eines jeden Stranges alkyliert wird⁵⁶⁾.

Diese Möglichkeit führt schon zu Veränderungen innerhalb der Sekundärstruktur des Doppelhelix, und zwar derart, dass eine Trennung der Stränge für die Reduplikation nicht mehr möglich ist.

Eine solche Hauptvalenzbindung der beiden DNS-Stränge ist auch auf anderem Wege erreicht worden^{57,58)}. Diese bekanntgewordenen Veränderungen durch Ultraviolett-Bestrahlung und Röntgenstrahlen

Fig. 9 (nach B. und A. Pullmann)

Die hauptsächlichen chemischen und physiko-chemischen Angriffspunkte der Stickstoffbasen der Nukleinsäuren.



Die mit einer ausgezogenen Linie unterstrichenen Bezeichnungen gehen den erstrangigen Angriffspunkt an, die mit unterbrochener Linie unterstrichenen Bezeichnungen den nächstwichtigen Angriffspunkt.

im Sinne einer Strangverklebung beziehen sich allerdings auf die Pyrimidin-anteile der DNS.

Um die Frage zu entscheiden, ob Stickstoff-Lost als monofunktionelles Agens wirkt oder als bifunktionelles ist einmal festzustellen, ob es sich bei den als N-Lost angegebenen Substanzen um identische Verbindungen handelt.

Alexander, Lett und Parkin⁶⁰⁾ sprechen N-Lost als monofunktionelles Agens an, verstehen aber unter N-Lost eine Verbindung folgender Formel: $(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$. Bei dieser Verbindung kommt es in wässriger Lösung nach Ansicht der Autoren nach Hydrolyse und Aktivierung durch die in β -Stellung entstehende Hydroxylgruppe bzgl. der DNS zur Transmethylierung im Sinn eines monofunktionellen Agens.

Andere Autoren⁶¹⁾ beschreiben Viskositätsabnahmen der DNS-Lösungen nach Einwirkung von N-Lost (Methyl-bis-(chloräthyl)-amin)^{62,63)}. Diese Ergebnisse wären im Sinn von Brüchen am Doppelhelix zu verstehen und im Sinn einer Abnahme des Molekulargewichtes der DNS^{64,65)}.

Die Alkylierung des Guanins in einem Strang führt zur Schwächung der Desoxyribosid-Bindung und damit zur Begünstigung eines Querbruches am Doppelhelix.

Die Schwierigkeiten in der Interpretation der Frage, ob N-Lost als bi- oder monofunktionelles Agens wirkt, ist vielleicht darin begründet, dass die Einwirkung von N-Lost entweder in wässriger Lösung oder auf wässrige Lösungen von DNS beschrieben wurde.

Das in unseren Versuchen verwandte Einwirkungsprodukt von N-Lost auf DNS wurde in Abwesenheit von Wasser gewonnen!

Wie ist nun die Wirkung der von uns getesteten, mit N-Lost behandelten DNS zu erklären?

Es scheint, dass ein enger Zusammenhang zwischen der DNS und DNase bei der DNS-Synthese besteht vor allem bei dem Problem der Primerentstehung in vivo.

Die in vitro mögliche Synthese von DNS aus den Nukleosidtriphosphaten des Adenins, Guanins, Cytosins und Thymins in Gegenwart der von Kornberg und seiner Gruppe^{17,18,19)} gefundenen Desoxyribonukleotid-Polymerase bedarf eines "primers", an dem sich die Komplementärsynthese vollziehen kann. Als solche kann nur einstrangige DNS fungieren. Dass einstrangige DNS durch Erhitzen von nativer DNS- melting out of the helix- experimentell erzeugt werden kann, wurde von Doty et al^{29,30)} geklärt.

Dagegen vermag native, doppelstrangige DNS nicht als Primer zu wirken, es sei denn, als "Verunreinigung" ist DNase in dem System enthalten.

Tab. 7

In-vitro-Wirkung reiner Desoxyribonuklease I aus Rinderpankreas
(Worthington)

=====		
Vermutliche Konzentration:		
1. in verschiedenen Zellen	0,01 - 3. 10 ⁻⁶ g/ml	34)
2. im Pankreas	150 . 10 ⁻⁶ g/ml	35)

Einheiten	10 ⁴ E entsprechen da.	36)
	10 ⁻³ g Worthingt. DNase	

Molekulargewicht	6 . 10 ⁴	37)

Isoelektrischer Punkt	pH 5,0	37)

pH-Wirkungsoptimum	pH 7,0	39)
Aktivatoren	Mg ⁺⁺ , Ca ⁺⁺ (Mn ⁺⁺) 0,05 M	

unspezifische	Komplexon, Phenol	40)
Inhibitoren		
spezifische	Extrakt aus Knochenmark,	41)
	Blutzellen	
	Crop Gland Inhibitor	42)

Klassifizierung	Endonuklease	43)

	im Mittel Tetranukleo-	44)
	tide	
Spaltstücke	16% Di-Nukleotide	45)
	ca. 1% Mononukleotide	
	Nukleosid-5'-Phosphate	43)

Vorzugweise gespal-		
tene Bindung		
(nie gefundene Bruch-	p-u-----p-y	38)
stücke)		

	p-u-p-u;	
Häufig gefundene	p-y-p-y;	
Spaltprodukte	p-y-p-u.	46)

Ca(bis(p-nitrophenyl)phosphat) ₂ wird nicht gespalten		
=====		

Versuche, diese "Verunreinigung" aus der Desoxyribonukleotid-Polymerase zu entfernen^{18,31)}, führten zur Inaktivierung des Enzyms bezüglich seiner Syntheseleistung, wenn statt einsträngiger doppelsträngige native DNS als Starter dem System zugefügt wurde.

Die in der Zelle vorkommende DNS ist doppelsträngig (nativ). Wie aber kommt es in vivo zur Entstehung einer einsträngigen DNS, wie sie für die DNS-Synthese erforderlich ist?

In der "Primerbildungstheorie" wird die DNase als primerbildendes Prinzip angesehen²²⁾. Diesen Effekt in vitro nachzuweisen, ist bisher noch nicht gelungen, da nur wenige Moleküle DNase in dem System im Sinne der Strangspaltung wirken könnten; in höheren Konzentrationen treten in vitro die Wirkungen der reinen DNase konkurrierend stark in den Vordergrund, wie sie in Tab. 7 zusammengestellt sind.

Für das N-Lost seinerseits ist anzunehmen, dass es unter Ausschaltung einer vorangehenden Hydrolyse als bifunktionelles Agens zu einer Hauptvalenzverknüpfung der beiden DNS-Stränge, jeweils über das Guanin geführt hat.

Die so veränderte DNS wäre dann durch spezifische Fermente, d.h. DNasen nicht mehr in einsträngige DNS spaltbar. Wird eine solche DNS in den Ehrlich-Ascites-Tumor injiziert, so wird es zwar zu einem Enzym-Substrat Komplex kommen, aber die DNase wird an diesem veränderten Substrat nicht ihre Wirkung entfalten können, sie wird im Sinn einer kompetitiven Hemmung für den Stoffwechsel der Ehrlich-Ascites-Tumorzelle wegfallen. Nach der "Primerbildungstheorie" ist aber die DNase das primerbildende Prinzip. Ohne Primer aber keine DNS-Synthese. Für den Ehrlich-Ascites-Tumor würde das wiederum ein Sistieren der Zellentwicklung bedeuten und damit Hemmung.

In eigenen Versuchen ließ sich nachweisen, dass DNase die mit N-Lost veränderte DNS nicht zu spalten vermag.

Das wesentliche Prinzip der Hemmung auf den Ehrlich-Ascites-Tumor wäre demnach die Hemmung der DNase durch das Angebot eines nicht abbaufähigen Substrates.

Da es sich bei diesem Substrat um eine doppelsträngige DNS handelt, deren beiden Stränge durch Hauptvalenzen miteinander fest verbunden sind, müßte sich die Voraussage machen lassen, dass auch auf anderem Wege gewonnene vernetzte DNS einen solchen Hemmeffekt zeigen würde.

Das ist in der Tat der Fall. Durch Ultraviolett-Bestrahlung vernetzte DNS zeigt den gleichen hemmenden Effekt - Versuche in dieser Richtung sind noch im Gange.

Es ist nun noch zu diskutieren, ob die hemmende Wirkung des von uns getesteten Produktes nicht ein Resultat von reinem N-Lost sein kann?

Hiergegen spricht das angegebene Herstellungsverfahren und die Toxizitätsprüfungen mit negativem Ergebnis.

Lettre fand, dass an Zelltrümmer gebundenes N-Lost das Wachstum des Ehrlich Ascites-Tumors hemmt. Dabei war die Mitochondrienfraktion wirksam, nicht aber die die DNS enthaltende Kern- und Kerntrümmerfraktion.⁶⁶⁾ Hier aber wurde an DNS-gebundenes N-Lost gegeben.

Als weitere Möglichkeit muß im Auge behalten werden, dass veränderte DNS in die Zelle einzudringen vermag⁶⁷⁾, Wie aber sollte es zum Einbau von Bestandteilen dieser veränderten DNS kommen, wenn diese durch DNasen nicht spaltbar ist?

Weiter wäre an die Möglichkeit einer Hemmung auf die Zellentwicklung durch das aus dem Nukleinsäureverband möglicherweise herausgebrochene alkylierte Guanin zu denken. Dagen spricht die Tatsache, dass Purine nicht in die Zelle eindringen können.

Auch die Versuchsergebnisse, dass unveränderte hochpolymere native DNS die Zellentwicklung der Tumorzellen nicht zu hemmen vermag, spricht für die oben diskutierte Auslegung der Hemmung des Ehrlich-Ascites-Tumors durch in beiden Strängen vernetzte DNS im Sinne einer kompetitiven Hemmung der DNase, denn für native DNS kann von DNase abgebaut werden.

Für die mit Fluor, also mit einem monofunktionellen Agens behandelte DNS ist eine Strangverknüpfung über Hauptvalenzen nicht wahrscheinlich. Ihre teilweise nachgewiesene Hemmwirkung auf den Ehrlich Ascites kann im gegenwärtigen Zeitpunkt nur unverbindlich als cytotoxisch bezeichnet werden, dafür spricht auch der schlechte Gesundheitszustand der Versuchstiere nach der Injektion größerer Mengen der mit Fluor behandelten DNS.

Zusammenfassung

1. Die Hemmung des Ehrlich-Ascites-Tumors der Maus durch intraperitoneale Injektion von Desoxyribonukleinsäure(DNS) und deren Derivaten wurde untersucht.
2. Die Injektion nativer hochpolymerer DNS erwies sich als unwirksam.
3. Fluorierte, also mit einem monofunktionellen Agens behandelte DNS zeigte nur in höheren Dosen eine Hemmung. Als Nebenwirkungen traten gleichzeitig toxische Schädigungen bei den Versuchstieren auf.
4. Die mit dem bifunktionellen Agens N-Lost behandelte DNS bewirkte eine absolute Hemmung im Sinn einer Regression des einmal angegangenen Tumors.

Bei allen, mit dieser Substanz behandelten Tumormäusen konnte auch nach 30 Tagen nach Versuchsbeginn kein Tumor nachgewiesen werden.

5. Der Mechanismus der N-Lost Wirkung auf die DNS wurde im Sinn einer Hauptvalenzverknüpfung der beiden DNS-Stränge interpretiert.
6. Der Hemmeffekt dieser durch Hauptvalenzbrücken vernetzten DNS auf den Ehrlich-Ascites-Tumor wird als kompetitive Hemmung der Tumor-DNase erklärt. Es wurde von der Theorie ausgegangen, dass die DNase als primerbildendes Prinzip bei der DNS - Synthese fungiert.

Literaturverzeichnis

1. Loewenthal, H. & G. John
Z. Krebsforsch. 37 / 439 (1932)
2. Lettré, H.
Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 268 / 59 (1941)
3. Lettré, H.
Z. Krebsforsch. 57 / 1 (1950)
4. Goldberg, L., E. Klein & G. Klein
Exptl. Cell Research 1 / 543 (1950)
5. Klein, G.
Cancer. 3 / 1052 (1950)
6. Klein, G.
The production of ascites tumors in mice and their use on studies on some biological and chemical characteristics of neoplastic cells.
Almqvist and Wiksells Boktryckeri. 1951 Upsala, Sweden.
7. Warburg, O. & E. Hiepler.
Z. Naturforsch. 7b / 193 (1952)
8. Hauschka, T. S. & A. Levan
Anat. Record. 111 / 467 (1951)
9. K. Sugiura,
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 / 962 (1956)
10. I. Koprowska.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 / 738 (1956)
11. Van der Waerden, B.L. u. E. Nievergelt
Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels x-Test und Zeichen-test.
Berlin, Göttingen, Heidelberg. Springer 1956
12. Lasintzki, I.
Brit. J. Cancer 7 / 238 (1953)
13. H. M. Patt and R. L. Straube.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 63 / 728 (1956)
14. Goldie H. & M. Felix.
Cancer Research 11 / 73 (1951)
15. Lettré, H.
Einige Versuche mit dem Mäuse Ascites Tumor.
Z. Krebsforsch. 57 / 1 (1950)
16. Nissenbaum, G.A.
Science, 118 / 31 (1953)
17. A. Kornberg
Angew. Chemie 72 / 231 (1960)
18. I. R. Lehman.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 81 / 745 (1959)
19. M.J. Bessman, I. R. Lehman, E.S. Simms and A. Kornberg
J. biol. Chem. 233 / 171 (1958)
20. J. D. Watson and F. H. Crick
Nature (London) 171 / 737 (1953)
21. J. D. Watson and F. H. Crick
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18 / 123 (1953)
22. R. K. Zahn
Vortrag am Rockefeller Inst. New York, N. Y. 21. am 20.10.1961

23. R. K. Zahn u. G. G. Kiefer
Exptl. Cell Research 19 / 460 (1960)
24. G. Kiefer, R. Kiefer, G. Zahn u. R. K. Zahn
Biochem. Z. 334 / 49 (1961)
25. R. K. Zahn, H. K. Müller, S. Müller u. G. Zahn
Biochem. Z. 331 / 518 (1959)
26. R. K. Zahn
Biochem. J. 76 / 66 (1960)
27. R. K. Zahn
Nature 184 / 1324 (1959)
28. D. Lang, A. Kleinschmidt u. R. K. Zahn
Proc. Eur. Reg. Conf. on Electr. Microsc. Delft 1960 Vol. II
29. J. Marmur, C. L. Schildkraut and P. Doty
15th Ann. Symp. on fundament. Cancer research (1961)
The Molecular Basis of Neoplasia
30. Doty, P., Boedtker, H., Fresco, J.R., Haselkorn, R. & Litt, M.
Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 45 / 482 (1959)
31. I. R. Lehman, M. J. Beesmann, E. S. Simms and A. Kornberg
J. biol. Chem. 233 / 164 (1958)
32. H. v. Euler
Deutsch. Med. Wschr. 85 / 1911 (1960)
33. H. v. Euler
Der Krebsarzt 15 / 97 (1960)
34. N. B. Kurnick
Arch. Biochem. Biophys. 43 / 97 (1953)
35. W. Baumgarten et al.
Arch. Biochem. Biophys. 77 / 206 (1958)
36. S. Zamenhof et al.
J. Biol. Chem. 180 / 727 (1959)
37. W. S. Spector
Handbook of Biological Data, London (1956)
38. G. Gehrman et al.
Biochim. Biophys. Acta 23 / 621 (1957)
39. G. S. Wiberg
Arch. Biochem. Biophys. 73 / 337 (1958)
40. O. D. Kowlessar et al.
Arch. Biochem. Biophys. 54 / 355 (1959)
41. H. H. Henstell et al.
Cancer Research 12 / 346 (1952)
42. W. Dabrowska et al.
J. Biol. Chem. 177 / 991 (1949)
43. M. Laskowski
Ann. N. Y. Acad. Sci. 81 / 776 (1959)
44. J. L. Potter et al.
J. Biol. Chem. 233 / 915 (1959)
45. R. L. Sinsheimer et al.
Science 144 / 92 (1958)
46. M. Privat de Garilhe et al.
Biol. Chem. 224 / 751 (1957)

47. B. Pullmann and A. Pullmann
Nature 189 / 725 (1961)
Submolecular Structure of the Nucleic Acids
48. Takemura, S. Biochim Biophys. Acta 29 / 442 (1958)
49. Takemura, S.
Bull. chem. Soc. Japan 32 / 920 (1959)
50. Lawley, P.D.
Proc. Chem. Soc. S. 290 (1957)
51. Reiner, E. & Zamenhof, S.
J. Biol. Chem. 228 / 475 (1957)
52. Wacker, A. & Ebert, M.
Z. Naturf. 146 / 709 (1959)
53. Brookes, P. & Lawley, R.D.
J. Chem. Soc. S 539 (1960)
54. Lawley, P. D. Biochim. B
Biochim. Biophys. Acta 26 / 450 (1957)
55. Brookes, P. & Lawley, P.D.
Biochem. J. 77 / 478 (1960)
56. Brookes, P. & Lawley, P.D.
Biochem. J. 80 / 496 (1961)
57. Beukers, R. & Berends, W.
Biochim. Biophys. Acta 49 / 181 (1961)
58. Wacker, A., Dellweg, H. & Weinblum, D.
Naturwissenschaften 47 / 477 (1960)
59. P. Alexander, K. A. Stacey
Nature 184 / 958 (1959)
60. P. Alexander, J. T. Lett, G. Parkin
Biochim. Biophys. Acta 48 / 423 (1961)
61. N. Harada und K. Yamana
Allgemeine Biologie und Biochemie 54 / 5397 (1950)
62. Butler, J.A. V., L. A. Gilbert and K. A. Smith
Nature 165 / 714 (1950)
63. Elmore, D.T., J. M. Gulland, O.D. Jordan and H. F. W. Taylor
Biochem. J. 42 / 308 (1948)
64. Butler, J. A. V., L. Gilbert and D.W.F. James
J. Chem. Soc. 3268 (1952)
65. Conway, B. E., L. Gilbert and J. A. V. Butler
J. Chem. Soc. 3421 (1950)
66. H. Lettré
Naturwissenschaften 41 / 188 (1954)
67. E. Borenfreund, A. Bendich
J. Biol. Biochem. Cytologie 2 / 81 (1961)
68. Romeis, B.
Mikroskopische Technik
Verlag Oldenbourg, München 1948

Es sei mir an dieser Stelle gestattet, meinen Dank auszudrücken.

Aufrichtig danke ich vor allen meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Zahn für dessen vielseitige Anregungen und das Interesse, dass er dieser Arbeit entgegenbrachte.

Auch Frau Kunz danke ich vielmals für ihre Anteilnahme und tatkräftige Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

Der Fa. Mack, Illertissen, sage ich Dank für die finanzielle Unterstützung und die Überlassung der dort hergestellten DNS-Derivate.

Herrn Prof. Schoop, Direktor des Instituts für Zoonosenforschung bin ich für die mikrobiologischen Untersuchungen sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Engelbart bei den Farbwerken Höchst danke ich für die Überlassung von Mäusen mit Ehrlich-Ascites-Tumor.

L e b e n s l a u f

Am 28. Oktober 1934 wurde ich als drittes Kind des Pfarrers Hermann Tiesler und seiner Ehefrau Meta, geborene Greth in Rabishau, Kreis Löwenberg geboren.

Die Volksschule besuchte ich bis zur vierten Klasse in Hindenburg O/S, bis zur 8. Klasse in Görlitz.

Von 1949 - 1952 ging ich in Görlitz zur Oberschule. Von 1953 bis 1954 besuchte ich die Oberrealschule an der Wölckernstraße in Nürnberg und beendete meine Oberschulbildung mit dem Abitur am 13. Juli 1954.

1954 begann ich mit dem Jurastudium an der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main.

1956 wechselte ich die Fakultät und studierte Medizin.

Am 27. Juli 1961 beendete ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen .

